

ÜBER DEN NACHWEIS
NEURONALER VERBINDUNGEN IM GEHIRN
DER KATZE MIT HILFE
VON MEERRETTICHPEROXYDASE

von

Reinhard Hickel

aus

Unterrodach jetzt Marktrodach

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Physiologie und Biokybernetik

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. med. W.D. Keidel

ÜBER DEN NACHWEIS
NEURONALER VERBINDUNGEN IM GEHIRN
DER KATZE MIT HILFE
VON MEERRETTICHPEROXYDASE

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Reinhard Hickel

aus

Unterrodach jetzt Marktrodach

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Prof. Dr. S. Kallert
Korreferent: Prof. Dr. W.D. Keidel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.1981

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	2
Auswahl der speziellen Methode für die Meerrettichperoxydasehistochemie	5
Methodik	10
Änderungen für die empfindlichere TMB-Methode nach Mesulam	21
Anwendung der Methodik am Beispiel der afferenten und efferenten Verbindungen zwischen Corpus geniculatum mediale und primärer Hörrinde	23
Diskussion	32
Zusammenfassung	38
Literaturverzeichnis	39



E i n l e i t u n g

Mikroelektrodenuntersuchungen von einzelnen Zellen des Zentralnervensystems, wie sie am Institut für Physiologie und Biokybernetik der Universität Erlangen seit etwa 20 Jahren durchgeführt werden (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22), sollen dazu beitragen, die funktionelle Bedeutung einzelner Kerngebiete des Gehirnes zu erkennen. Da jedoch als funktionelle Grundbaueinheit des Zentralnervensystems nicht so sehr das Neuron als vielmehr der Leitungsbogen anzusehen ist, wird es gerade im Zusammenhang mit derartigen elektrophysiologischen Untersuchungen erforderlich, die zu den untersuchten Einheiten gehörenden Leitungsbögen, das heißt also die Verbindung zu anderen Neuronenpopulationen anatomisch nachzuweisen.

Ein Beispiel möge dies anschaulich erläutern. Bei der Untersuchung der Antwortmuster einzelner Zellen des Corpus geniculatum mediale (Thalamuskern der Hörbahn) auf Schallreize ließen sich neben solchen, die vermutlich der Analyse von Lauten mit Vokalcharakter und anderen, die eventuell der Analyse von Lauten mit Konsonantcharakter dienen mögen, auch Antwortmuster finden, die ungewöhnlich lange Latenzzeiten oder weit über die Reizdauer hinausreichende Erregungsänderungen zeigten (Abb. 1). Läßt man in hinreichend kurzem Abstand zwei verschiedene Schallreize einwirken, für die die Latenzzeiten oder die über die Reizdauer hinauswirkende Erregungsdauer der gerade untersuchten Zelle entsprechend unterschiedlich sind, so kann das durch den ersten Reiz ausgelöste Erregungsmuster durch den nachfolgenden Reiz modifiziert werden und umgekehrt. Es wäre deshalb denkbar, daß diese Erregungsform dem Ultrakurzzeitgedächtnis (= sensorisches Gedächtnis) dienen könnte, das z.B. zwei Wörter wie "Futter" und "Mutter" zu unterscheiden erlaubt, indem während des Ablaufes von "utter" das "F" oder "M" noch wirksam ist.

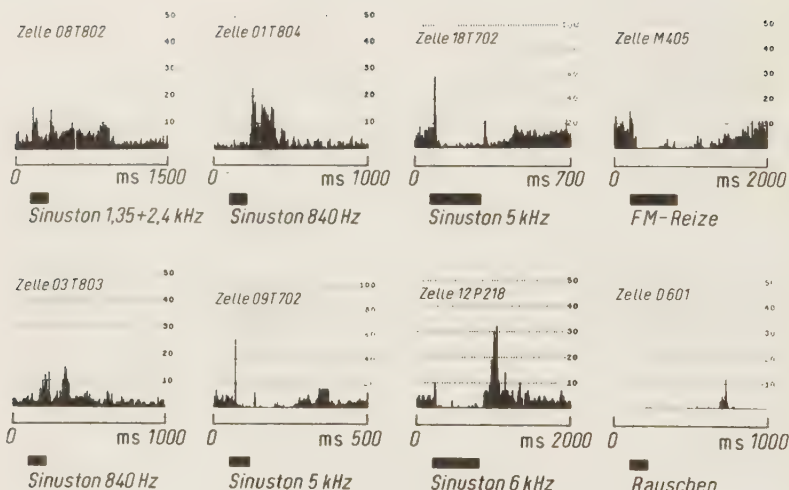


Abb. 1: Charakteristische Latenz- und Nacheffektzeiten in Reizantwortmustern von Zellen des Corpus geniculatum mediale wie sie sich im Reizfolgehistogramm darstellen. Als Reizfolgehistogramm wird die reizbezogene zeitliche Häufigkeitsverteilung von Aktionspotentialen bezeichnet. Die Abszisse ist die Zeitachse (als Zeitnullpunkt wird meist ein definierter Zeitpunkt vor Beginn des Reizes gewählt, so daß auch die zeitliche Entladungsdichte vor Reizbeginn deutlich wird). Die Ordinate gibt die Anzahl registrierter Aktionspotentiale pro bin (= konstantes Zeitintervall, nämlich die durch Programm und Rechner bestimmte Zeitauflösung der Abszisse) und pro vorgegebener Reizzahl an. Die Reize sind zeitgerecht jeweils unter der Abszisse eingezeichnet. Jedem Histogramm liegen 20 bzw. 50 Reize zugrunde. Normalerweise betragen die Latenz- und Nacheffektzeiten nur 5 bis höchstens 50 ms. (Nach Kallert 1980.)

Ein dieser Funktion zugrundeliegender Leitungsbogen könnte die primäre Hörrinde mit einschließen, denn durch reversible Ausschaltung der primären Hörrinde konnten derartige Erregungsmuster von Geniculatumzellen unterdrückt werden (Abb. 2).

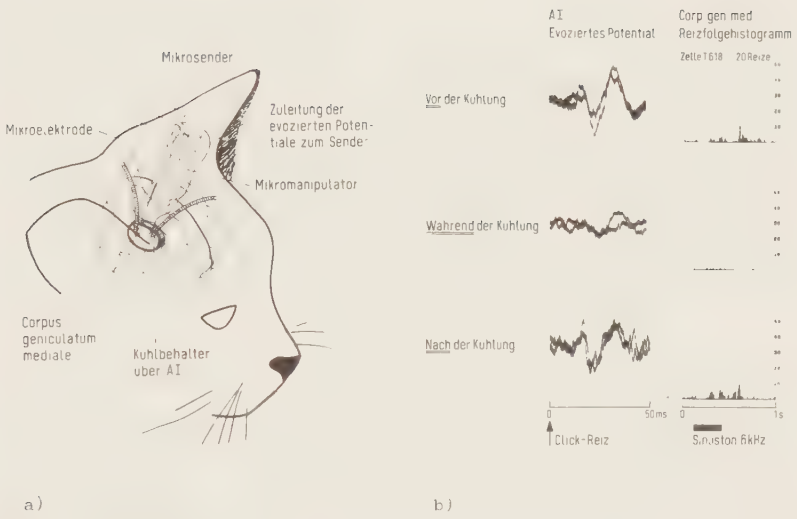


Abb. 2: Reversible Kälteblockade der primären Hörrinde bei der wachen Katze. Als Kriterium für die Wirksamkeit der Kälteblockade dient der Ausfall der durch Clickreize ausgelösten akustisch evozierten Rindenpotentiale.

a) Lokalisation des epidural implantierten Kühlbehälters und der axial verschiebbaren Mikroelektrode, deren Spitze das Corpus geniculatum mediale erreicht (Verlauf innerhalb des Gehirnes gestrichelt).

b) Durch Clickreize ausgelöste, von der primären Hörrinde abgeleitete evozierte Potentiale (jeweils zwei Kurven übereinander) und Reizantwortmuster einer Zelle im Corpus geniculatum mediale. Unter der Abszisse ist die Reizdauer symbolisch angegeben. Die Ordinate gibt die zeitliche Dichte der registrierten Aktionspotentiale an (Anzahl pro bin ≈ 4 ms und pro 20 Reize).

(Nach Kallert und Kroha 1978.)

Die den elektrophysiologischen Befunden zunächst hypothetisch zugeordnete funktionelle Deutung bedarf der Bestätigung durch geeignete Verhaltensversuche (Wünsche, B.), aber es müssen vor allem auch die dazu erforderlichen anatomischen Grundlagen nachgewiesen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, unter den speziellen durch das Institut vorgegebenen Bedingungen für derartige histologische Unter-

suchungen eines der schon in anderen Laboratorien bewährten Meerrettichperoxydase-nachweisverfahren so aufzubauen, daß es in Zukunft routinemäßig genutzt werden kann.

Die Meerrettichperoxydase-methode beruht darauf, daß Meerrettichperoxydase von den axonalen Endigungen durch Pinozytose aufgenommen, durch retrograden axoplasmatischen Transport zum Zellkörper hin transportiert und dort gespeichert wird. Sie kann dann durch geeignete Peroxydasereaktionen mikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Auswahl der speziellen Methode für die Meerrettichperoxydase-histochemie

Der retrograde axonale Transport^{*)} von Meerrettichperoxydase wurde zuerst von Kristensson und Olsson im Jahre 1971 beschrieben. Sie injizierten die Peroxydase in den Musculus gastrocnemius und konnten sie nachfolgend histochemisch in den spinalen Motoneuronen nachweisen. Diese Technik wurde inzwischen in großem Umfang zum Nachweis neuronaler Verbindungen im zentralen und peripheren Nervensystem benutzt. Zunächst wurde dazu vor allem die ursprünglich von Graham und Karnovsky (1966) eingeführte und dann von LaVail und LaVail (1974) modifizierte Methode benutzt. In den letzten Jahren sind jedoch mehrere neue Verfahren beschrieben worden, die in verschiedener Hinsicht der LaVail-Methode überlegen sein sollen (1, 6, 9, 10, 14, 29, 30, 31, 40, 41, 42, 49, 51).

Tabelle 1 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Besonderheiten der neueren Verfahren.

^{*)} Es gibt auch einen anterograden Transport der Meerrettichperoxydase, der hier aber nicht betrachtet werden soll.

Tabelle 1: Eigenheiten der Methoden

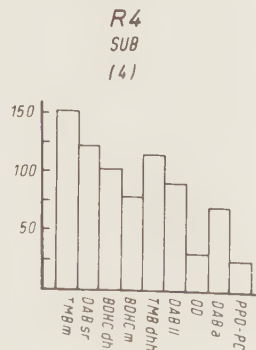
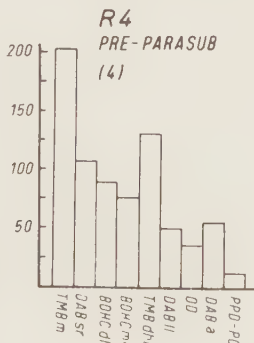
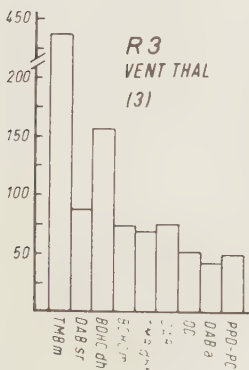
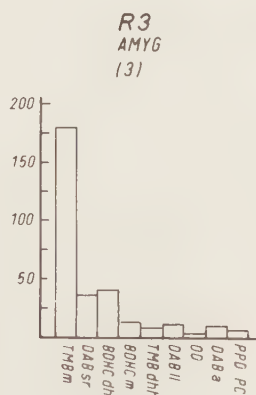
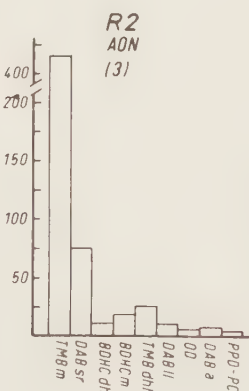
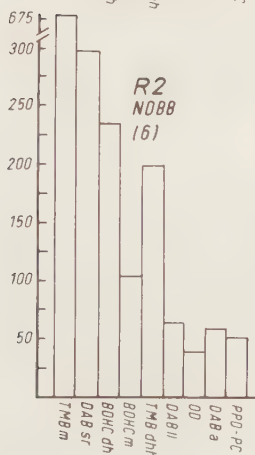
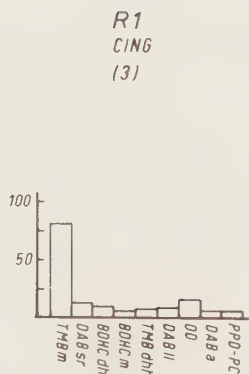
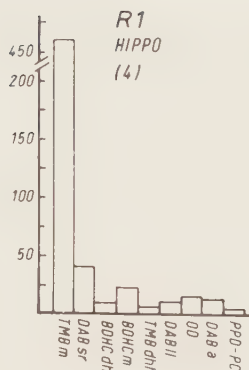
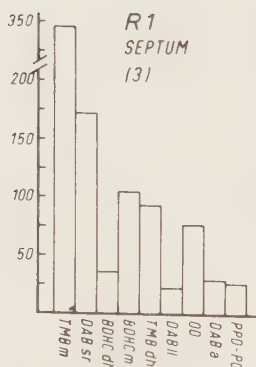
Abkurzungen der Verfahren	Quelle	Färbe- und Entwicklungsparameter						Zusätzliche Schritte	Beleuchtung
		Färbereagenz	Pufferlösung	Alkohol	Temperatur	Zusätze	Zeit (min)	H ₂ O ₂ (%)	Farbe
MB(m)	Mesulam 1978	Tetramethylbenzidin 5 mg / 100 ml	Acetat 0,01 m, pH 3,3	2-3 % Äthanol	19 - 23° C	Natriumnitroprussid	20	0,009	blau
	Sternit & Neider 1977	Diaminobenzidintetrahydrochlorid 10 mg / 100 ml	Zitronensäureammoniumacetat 0,05 m, pH 5,0	keiner	19 - 23° C	p-Kresol	60	0,01	braun
BDHC(dh)	De Olmos & Heimer 1977	Benzindihydrochlorid 88 mg / 100 ml	Acetat 0,01 m, pH 4,3	45 % Methanol	-10° C	DMSO; Gelatine CoCl ₂ ; Natriumnitroprussid	130	Stufenweise Erhöhung von 0,004 bis 0,028	blau
BDHC(m)	Mesulam 1976	Benzindihydrochlorid 50 mg / 100 ml	Acetat 0,01 m, pH 5,0	30 % Äthanol	19 - 23° C	Natriumnitroprussid	25	0,012	blau
THB(dhh)	De Olmos, Hardy & Heimer 1978	Tetramethylbenzidin 6,5 mg / 100 ml	Acetat 0,0009 m, pH 4,3	14 % Äthanol	0° C	DMSO; Gelatine Natriumnitroprussid	60	Stufenweise Erhöhung von 0,009 bis 0,018	blau
DAB(11)	La Voil & La Voil 1974	Diaminobenzidintetrahydrochlorid 50 mg / 100 ml	Phosphat 0,1 m, pH 7,4	keiner	19 - 23° C	keine	20	0,01	braun
O - D	De Olmos 1977	o-Dianisidin 38 mg / 100 ml	Acetat 0,012 m, pH 4,3	14 % Methanol	-5° C	DMSO; Äthylenglykol; Natriumnitroprussid	120	Stufenweise Erhöhung von 0,02 bis 0,06	grün
DAB(a)	Adams 1977	Diaminobenzidintetrahydrochlorid 50 mg / 100 ml	Phosphat 0,1 m, pH 7,3	keiner	19 - 23° C	keine	15	0,01	blau-braun
PPD - PC	Hanker, Yano, Metz & Kuchel 1977	p-Phenyldiamin (1 Teil) - Pyro-Katechol (2 Teile) 150 mg / 100 ml	Tris 0,1 m, pH 7,6	keiner	19 - 23° C	keine	20	0,01	braun

Es zeigt sich, daß die Sensitivität sowohl im Hinblick auf den Nachweis axonal transportierter Meerrettichperoxydase als auch hinsichtlich der Beurteilung der Injektionsstellenbegrenzung sehr von der Wahl der histochemischen Prozedur abhängt. Eine gute Nachweisempfindlichkeit ist aber für die Meerrettichperoxydase-methode von ausschlaggebender Bedeutung. Abbildung 3 soll verdeutlichen, wie es bei zu geringer Nachweisempfindlichkeit sowohl zu positiv als auch zu negativ falschen Ergebnissen kommen kann.



Abb. 3: Schematische Darstellung von zwei möglichen experimentellen Situationen, die die potentiellen Gefahren weniger guter Meerrettichperoxydaseverfahren veranschaulichen. Während der äußere Kreis die wirklichen Grenzen der Injektionsstelle anzeigt, kann eine weniger effektive Methode die Markierung nur in dem grauen Gebiet zeigen. Es ist denkbar, daß das Perikaryon A nicht fähig ist, genügend Peroxydase für eine positive Reaktion aufzunehmen, obwohl seine Kollateralen in dem inneren grauen Gebiet liegen. Der Zellkörper B, dessen Hauptaxon sich zahlreich in dem ungefärbten Bereich der Injektionsstelle verzweigt, kann andererseits genügend Peroxydase für eine positive Reaktion aufnehmen und man folgert daraus, daß das Neuron in dem grauen Gebiet endet. (Nach de Olmos 1977.)

Tabelle 1: Charakteristische Merkmale verschiedener Meerrettichperoxydaseverfahren. Die in der linken Spalte eingesetzten Abkürzungen ergeben sich aus dem jeweils benutzten Färbereagens. Wurde bei mehr als einer Methode das gleiche Färbereagens verwendet, so wurden der oder die Anfangsbuchstaben des oder der Autoren hinzugesetzt. Die unter Färbereagens- und Entwicklungsparameter aufgeführten Werte beziehen sich auf die für den Vergleich benutzten Entwicklungslösungen (DMSO: Dimethylsulfoxyd). (Nach Mesulam und Rosene 1979.)



Nach Mesulam und Rosene 1979 ist die in Tabelle 1 als TMB(m)-Technik bezeichnete Methode an Sensitivität den anderen acht Variationen deutlich überlegen (Abb. 4).

Bis zum Erscheinen der die verschiedenen Methoden miteinander vergleichenden Übersicht von Mesulam und Rosene im Jahre 1979 galt aber die in Tabelle 1 als BDHC(m)-Technik bezeichnete Prozedur als besonders geeignet (32). Sie wurde deshalb für die vorliegende Arbeit benutzt. Bei ihr wird allerdings das carcinogenverdächtige

Abb. 4: Diese Diagramme veranschaulichen für jede der neun verschiedenen MPO-Reaktionsmethoden die relative Effektivität, indem sie die retrograd markierten Neuronen in neun verschiedenen afferenten Systemen zeigen. Bei jedem Diagramm gibt die Ordinate die mittlere Zahl der mit MPO markierten Neuronen an, die an dem jeweiligen anatomischen Ort festgestellt wurden. Die MPO-Injektionsstellen sind wie folgt:

- R 1 Hippocampus und Neocortex
- R 2 Bulbus olfactorius
- R 3 Neocortex
- R 4 entorhinaler Cortex

Unterhalb der jeweiligen Injektionsstellenbezeichnung ist angegeben, wo MPO-markierte Neuronen gefunden wurden; die Zahl der verglichenen Schnitte, die für die jeweilige Reaktionsmethode ausgewertet wurden, ist in runden Klammern angegeben. Diese Diagramme veranschaulichen sowohl die ständige Überlegenheit der TMB(m)-Methode, als auch die relative Effektivität und Veränderlichkeit der anderen Reaktionsmethoden. Zu beachten ist die absolute Zahl der Neuronen über der unterbrochenen Ordinate an den anatomischen Orten, wo die große Zahl der markierten Neuronen, die mit der TMB(m)-Methode gefunden wurden, nicht in einer durchgehenden Skala veranschaulicht werden konnte. In den Gebieten AON, HIPPO, Pre- und Parasub wurden die Neuronen auf der kontralateralen Seite der Injektionsstelle gezählt.

Anatomische Abkürzungen:

AMYG	Corpus amygdaloideum
AON	Nucleus olfactorius anterior
CING	Gyrus cinguli
HIPPO	Hippocampus
NDBB	Kern des diagonalen Bandes von Broca
Pre- und Parasub	Präsubiculum und Parasubiculum
SUB	Subiculum
VENT THAL	ventraler Thalamus

(Nach Mesulam und Rosene 1979.)

Benzidindihydrochlorid als Chromogen verwendet. Das für die TMB(m)-Methode benutzte Tetramethylbenzidin gilt dagegen als nicht carcinogen und wurde wohl zunächst auch vor allem deshalb als Chromogen eingeführt (10). Es wurde zum erstenmal von Holland et al. (1974) anstelle von Benzidin zum Blutnachweis benutzt, für den Nachweis axonalen Meerrettichperoxydasetransportes wurde es aber erst ab 1977 (10, 31, 42) eingeführt. Eine Umstellung der hiermit im Physiologischen Institut aufgebauten Routinemethodik auf Tetramethylbenzidin als Chromogen ist ohne Aufwand möglich und auch vorgeesehen.

M e t h o d i k

Die Versuche wurden an mit Nembutal^(R) (ca. 1 ml/kg i.p. als Anfangsdosis) narkotisierten erwachsenen Katzen durchgeführt. Nach Eintritt der Narkose werden die Tiere an der Zahnreihe des Oberkiefers in einem stereotaktischen Gerät befestigt. Dazu wird ein vorher in geeigneter Größe angefertigter Metalllöffel mit Paladur^R (schnellhärtender, kaltpolymerisierender Universalkunststoff auf Pulver-Flüssigkeitsbasis der Firma Kulzer, Bad Homburg) gefüllt und etwa drei Minuten der narkotisierten Katze fest auf die obere Zahnreihe gedrückt. Die Zähne der Versuchstiere sollen sauber und trocken sein, damit der Löffel gut hält. Bei wenigen Retentionen der Zähne oder bei großen Belastungen während der Operation kann der Zahnschmelz an mehreren Stellen aufgeraut werden; eine gute Fixierung des Kopfes ist dadurch gewährleistet. Zur leichteren Entfernung am Ende der Operation wurde der Metalllöffel teilbar gestaltet. Zum Herausnehmen schraubt man den Löffel auseinander und kann so die beiden Hälften gegeneinander abhebeln. Durch Einfügen von 1 mm starken Plättchen zwischen die beiden Löffelteile ist der Löffel für jedes Versuchstier individuell anpaßbar. Der Löffel wird dann an eine am Rahmen des stereotaktischen Gerätes befestigte

Vorrichtung angeschraubt, die bezogen auf die drei senkrecht aufeinanderstehenden Raumachsen weitgehend voneinander unabhängige Linear- und Drehbewegungen erlaubt, so daß der Kopf des Tieres innerhalb vernünftiger Grenzen in jede beliebige Stellung gebracht werden kann (Abb. 5 und 6).

Für eine präzise Einstellung des Kopfes auf die für die Benutzung stereotaktischer Atlanten übliche Normalhaltung werden mit einem Taster der Orbitalrand und mit einem nicht-flexiblen Endoskop die beiden Trommelfelle optisch auf die vorgeschriebene Lage eingestellt. Als stereotaktischer Atlas für die Injektion in das Corpus geniculatum mediale wurde der Atlas von Reinoso-Suarez 1961 benutzt.

Nach Freilegung und Eröffnung der Schädelkalotte wurde die Injektion der Meerrettichperoxydase vorgenommen. Dazu wurde zunächst die MPO-Lösung hergestellt. Zu allen Versuchen wurde Peroxydase aus Meerrettich (Lyophilisat) mit Reinheitsgrad I von der Fa. Boehringer, Mannheim, verwendet. Für einen Versuch wurde eine bestimmte Menge MPO abgewogen und eine entsprechende Menge steriler isotonischer Kochsalzlösung dazupipettiert, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Die Konzentrationen lagen zwischen 10 % und 17 %; in den meisten Versuchen wurde 15 %ige MPO-Lösung genommen ($\hat{=}$ 10 mg MPO auf 66 μ l NaCl-Lösung). Das MPO-Lyophilisat wurde mit der Kochsalzlösung in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Rüttler ca. 1 min lang aufgelöst. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in die Zentrifuge gesetzt und der Inhalt 1 min lang bei ca. 15000 U/min weiter vermischt.

Zur Injektion der MPO-Lösung wurde eine Glaspipette hergestellt, die über einen Schlauch an eine Motorpumpe angeschlossen wird. Mit Hilfe einer Glühspirale und eines Elektromagneten wurden Glasröhrchen in der Mitte geschmolzen und dünn auslaufende Spitzen gezogen. Die Länge der Spitzen konnte durch Potentiometerverstellung für Magnet oder Glühspirale variiert werden. (Die Werte für eine Glühspirale mit 4 Windungen und 6 mm Durchmesser waren für die Heizung 5,2 Skalenteile

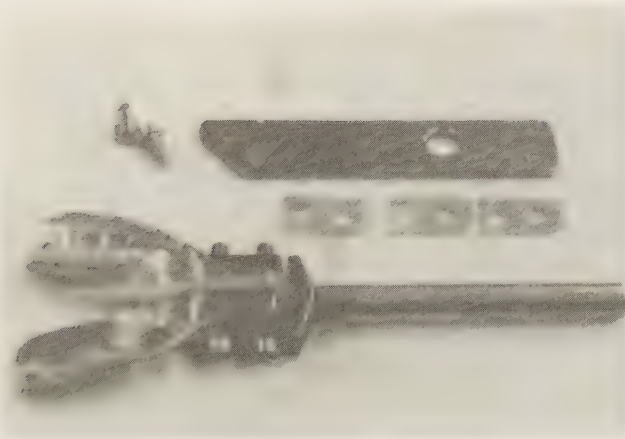


Abb. 5: Metalllöffel. Der Löffel ist durch Einfügen der Plättchen zwischen die beiden Löffelteile individuell verstellbar. Das eingeschraubte Papier in der Löffelmitte verhindert ein Verbinden des Kunststoffes der linken und rechten Löffelhälfte, so daß der Löffel am Ende der Operation leicht geteilt werden kann. Dazu entfernt man die beiden langen Schrauben und schraubt an das Löffelende ohne Halterung einen Griff an; so kann man die beiden Löffelteile gegeneinander abhebeln.



Abb. 6: Versuchstier mit dem Löffel am Rahmen des stereotaktischen Gerätes befestigt.

($\pm 16,5$ A) und für Magneten 5,5 Skalenteile. Eine Erhöhung des Heizungsstromes um 0,5 A bewirkte eine 2 - 3 mm länger ausgezogene Spitze.)

Der Schaft der Glaspipette darf nicht zu lang sein, da sonst das Volumen der Glaspipette zu groß ist, um mit der Pumpe luftfrei mit Öl gefüllt werden zu können (je nach Durchmesser $\approx 4 - 5$ cm). Andererseits muß aber die Glaspipette lang genug sein, damit die Spitze bei der Injektion auch in subcorticale Bereiche vorgeschoben werden kann.

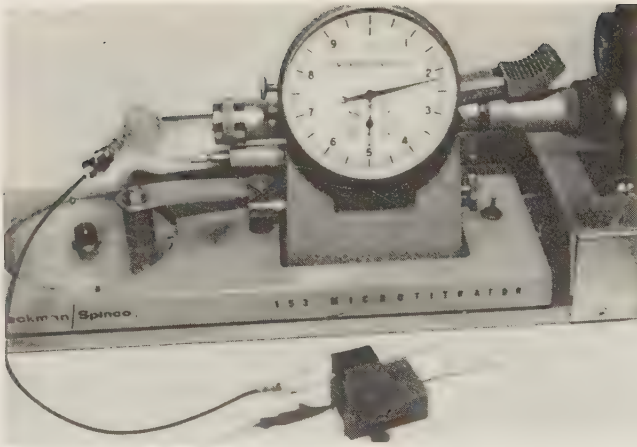
Das Spitzenende kann mit einem Skalpell abgeschnitten werden, um eine genügend große Öffnung zur Injektion der MPO zu bekommen. Bei den oben angegebenen Werten der Glasziehvorrichtung entspricht das Kürzen der Spitze um 1 mm einer Vergrößerung der Öffnung um ca. 10 μ m. Der Durchmesser der Öffnung wurde dann mit einer geeichten Skala unter dem Mikroskop ausgemessen. Die verwendeten Öffnungsdurchmesser lagen zwischen 10 und 70 μ m. Die günstigsten und am häufigsten verwendeten Werte waren im Bereich von 30 bis 50 μ m. Bei zu kleinen Durchmessern (≤ 20 μ m) trocknet die mit MPO-Lösung gefüllte Spitze (v.a. bei höheren Konzentrationen) sehr schnell ein, so daß keine Injektion mehr möglich ist. (Außerdem wird der Unterdruck bzw. Druck bei zu schnellem Aufsaugen bzw. Abgeben im System Pumpe - Schlauch - Pipette zu hoch, so daß sich Meßungenauigkeiten einschleichen können.)

Ein Versuch, gleichzeitig durch die Pipette Potentiale vom Geniculatum mediale abzuleiten, scheiterte, weil bei den für die Ableitung nötigen Durchmessern (~ 5 μ m) die verwendete MPO (Konz. 15 %) in der Spitze sofort eintrocknete. Günstig sind dünne Durchmesser (ca. 30 μ m) für die Injektion in die Rinde, weil die Spitze die Leptomeninx sofort durchsticht, ohne daß die Rinde punktuell eingedrückt wird. Dadurch ist eine präzise Lage der Spitze in einer bestimmten Rindenschicht gewährleistet.

Um die Glaspipette an die Motorpumpe und den Schlauch anschließen zu können, wird sie mit einem Ansatzstück versehen, dessen passendes Gegenstück am Schlauch fest montiert ist. Als Ansatzstück, das jederzeit erneuert werden kann, wird der Lueransatz einer (Blutentnahme-)Kanüle genommen. Nach Entfernung der Metallnadel über dem Bunsenbrenner wird der Kunststoffansatz weiter aufgebohrt, so daß der Schaft der Glaspipette durchgeschoben werden kann. Der Kunststoffansatz (ohne die Glaspipette) wird von der aufgebohrten Seite her mit Paladur gefüllt, so daß der Luerkonusbereich unverseht bleibt. Am Pipettenschaftende muß das Lumen mit einem passenden Stift (Metallnadel z.B.) abgedichtet werden, damit beim Einschieben ins Paladur kein Kaltpolymerisat ins Lumen eindringen kann. Wenn der Pipettenschaft im Kunststoffansatzstück richtig plaziert ist, wird der Metallstift wieder herausgezogen, damit er nicht festpolymerisiert. Vor dem Polymerisieren muß man darauf achten, daß das Paladur überall dicht hingeflossen ist und kein toter Raum entsteht. (Paladurmenge noch etwas regulierbar durch geringfügiges Hineinschieben oder Herausziehen des Pipettenschaftes.) Das Paladur braucht ca. 5 min bis es ausgehärtet ist. Der Konusansatz, der auf den Schlauch der Motorpumpe aufgesteckt wird, muß unverseht bleiben, damit das ganze System später absolut dicht ist (Abb. 7a, b).

Die Injektionsvorrichtung besteht, wie erwähnt, aus der Motorpumpe, einem Schlauch und der Glaspipette, die zur Injektion in das stereotaktische Gerät eingespannt wird. Die Pumpe wird mit einem Elektromotor angetrieben und ist auf 2 μ l/h eingestellt. Eine manuelle Bedienung der Pumpe ist ebenfalls möglich. (Die Anzeigegenauigkeit beträgt 10^{-2} μ l.) Der Übergang von der Pumpe zum Schlauch und vom Schlauch zur Glaspipette wird jeweils durch Konuspässungen (Luer) hergestellt. Der Schlauch dient dazu, daß die Pipette zur Injektion mit dem stereotaktischen Gerät bei feststehender Pumpe bewegt werden kann. Der Schlauch sollte ein möglichst kleines Innenvolumen haben und auch unter Druck hinreichend volumenkonstant sein.

Um Volumenmeßungenauigkeiten zu vermeiden, muß das ganze System Pumpe - Schlauch - Pipette absolut luftfrei sein. Zuerst wird der



a)



b)

- Abb. 7: a) Die Injektionsvorrichtung besteht aus der Pumpe, einem 20 cm langen Schlauch und der Glaspipette, die zur Injektion in das stereotaktische Gerät eingespannt wird.
- b) Der Schlauch soll ein möglichst kleines Innenvolumen haben und auch bei den erforderlichen Drucken hinreichend volumenkonstant sein. Eine Glaspipette enthält einen Silberdraht, der für die Ableitung von Potentialen verwendet werden kann.

Pumpenzylinder mit Öl gefüllt und dann der Schlauch fest aufgesteckt. Durch manuelles Vorpumpen wird der Schlauch mit Öl gefüllt. Dabei wird das freie Schlauchende nach oben gehalten, um mögliche Luftblasen zu vermeiden. Der ölgefüllte Luftschlauch wird nun mit dem freien Ende in einen Behälter mit Öl getaucht und die Pumpe kann durch den Schlauch Öl aufsaugen. Dieser Vorgang ist nötig, weil das Pumpenvolumen nicht groß genug ist, die Glaspipette und den Schlauch in einem Vorgang luftfrei mit Öl zu füllen. Nachdem die Pumpe am hinteren Anschlag ist, wird die Glaspipette auf das freie Schlauchende fest aufgesteckt. Wie beim Schlauch wird nun auch die Glaspipette durch Vorlauf der Pumpe mit Öl gefüllt, wobei wiederum zum Vermeiden von Luftblasen die Spitze nach oben gehalten wird.

Das Reaktionsgefäß mit der fertig angemischten MPO-Lösung wird in ein Stativ gespannt. Die Glaspipette wird mit der Spitze nach unten in der Halterung der stereotaktischen Gerätes befestigt. Mit Hilfe der Mikrometerschrauben wird die Pipettenspitze in die MPO-Lösung eingetaucht. Durch manuellen Rücklauf der Pumpe wird nun die MPO-Lösung langsam in die Glaspipette aufgezogen. Die mit MPO-Lösung gefüllte Glaspipette muß immer mit der Spitze nach unten zeigen, weil sich, bereits bei waagrechter Lage, die MPO-Lösung und das Öl durchmischen würden. (Bei zu schnellem Aufsaugen muß die Pipettenspitze noch kurze Zeit in der MPO-Lösung bleiben, um nicht möglicherweise Luft aufzuziehen (v.a. bei sehr kleinen Spitzenöffnungen)). Vor dem Einstechen in die Leptomeninx sollte ein Probetropfen MPO-Lösung abgegeben werden, z.B. auf einen Tupfer, um die Durchgängigkeit der Spitzenöffnung zu überprüfen. (Bei eingetrockneter Spitze nützt es, einen Tropfen Aqua bidest. an die Spitze zu halten; durch gleichzeitiges Vorpumpen wird die Öffnung meist wieder frei.)

Das Zielen und Einstechen der Glaspipette wird mit den Mikrometerschrauben des stereotaktischen Gerätes vorgenommen. Bei Injektionen in die Rinde sollte man immer senkrecht zur Rindenoberfläche einstechen, um die genaue Lage der Spitze in der Rindenschicht ermitteln zu können.

Die Injektionsmengen schwankten zwischen 0,6 und 2,0 μ l. (Bei den meisten Versuchen wurden 0,7 - 1,0 μ l injiziert.) Die Injektion wurde mit dem Elektromotor der Pumpe vorgenommen, der 1 μ l in 30 min injizierte. Nach Beendigung der Injektion wurde die Glaspipette noch 15 - 20 min am Ort belassen, ehe sie zurückgezogen wurde. (Abb. 8 und 9)

Nach Abschluß des Injektionsverfahrens wurde die Operationsstelle sofort zugenäht und Antibiotika lokal und i.p. gegeben. Zusätzlich erhielten die Versuchstiere Glucose i.p.

Nach 46 - 50 h Überlebenszeit wurden die Katzen transkardial durchgespült. Dazu wurden sie vorher tief narkotisiert. Die Durchspülung wurde mit 2,0 - 2,5 l Plasmaexpander begonnen. Um möglichst alle Erythrozyten herauszuspülen, wurden noch 10 ml Novocain[®] zur Kapillardilatation kurz vor Umstellen auf die Fixationslösung zugegeben. Dazu wurde der Druck von 100 mm Hg auf 40 - 50 mm Hg reduziert, um Gefäßrupturen und damit eine schlechtere Durchspülung zu vermeiden. Die Fixationslösung bestand aus 1,25 % Glutaraldehyd und 0,8 % Paraformaldehyd (bzw. Formaldehyd) in 0,08 molar Phosphatpuffer pH 7,3 - 7,4. Zur Fixierung wurden 2,5 l dieser Lösung verwendet. Beide Lösungen wurden vorher auf 37° C gebracht.

Nach Beendigung der transkardialen Durchspülung wurde das Gehirn sofort entnommen und in eine Phosphatpufferlösung (0,08 molar, pH 7,4) mit 10 % Saccharose für ca. 12 h bei 4° C gelegt. Da aus personellen und materiellen Gründen nur eine Hemisphäre an einem Tag verarbeitet werden konnte, lag die zweite Hemisphäre jeweils 36 h in der Phosphatpufferlösung bei 0° - 4° C.

Um am Mikrotom exakte Horizontal- bzw. Frontalschnitte ausführen zu können, wurde das Gehirn in einen Schädel reponiert, der in einer Schneidevorrichtung ausgerichtet ist. Es wurden aus dem Gehirn definierte Blöcke herausgeschnitten, deren Schnittebenen jeweils parallel zur Horizontal-, Frontal- oder Sagittalebene waren. Als Horizontalebene wurde die Frankfurter Horizontale benutzt.

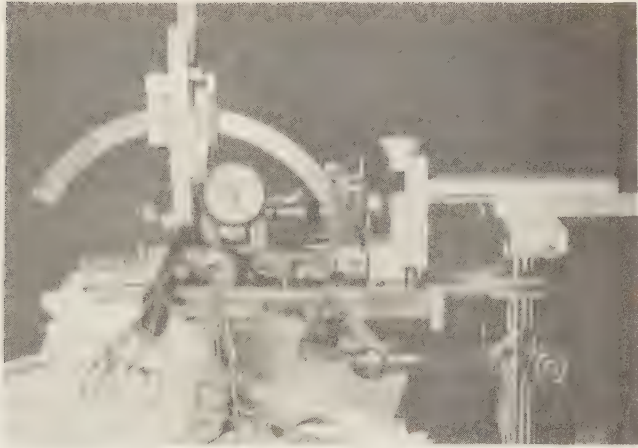
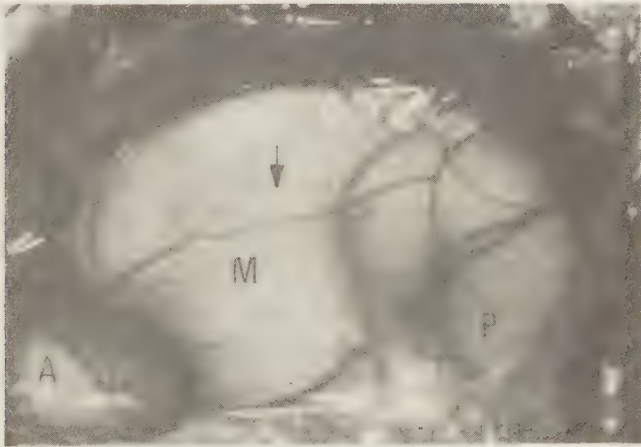


Abb. 8: Legende s.S. 19

a)



b)

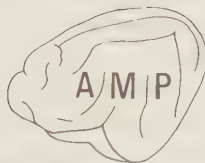


Abb. 9a,b: Legende s.S. 19

Abb. 8: Injektionsvorrichtung mit stereotaktischem Gerät während der Injektion von MPO in das Genuculatun mediale.

Abb. 9: a) Nach Eröffnung der rechten Schädelkalotte und Entfernung der Dura mater sieht man die primäre Hörrinde (AI). Der Pfeil gibt die Einstichstelle an, die bei Injektionen in die primäre Hörrinde immer gewählt wurde.

A	Gyrus	ectosylvius	anterior
M	"	"	medius
P	"	"	posterior

b) Schematische Übersicht der rechten Hemisphäre.

Je Hemisphäre wurden zwei Blöcke ausgeschnitten, die das Genuculatun mediale oder die primäre Hörrinde enthielten. Bei der Rinde wurden Frontalschnitte, beim Genuculatun mediale Horizontalschnitte ausgeführt. Die Schnittdicke am Gefriermikrotom war auf 50 µm eingestellt. (Es wurde nur jeder 5. bzw. 10. Schnitt für die Histologie verwendet.)

Das erste Bad, in das die Schnitte für 20 min gelegt wurden, hatte eine Temperatur von 20° C (Zimmertemperatur). Die Lösung bestand aus 0,05 % Benzidindihydrochlorid, 0,1 % Natriumnitroprussid und 30 % Alkohol in Aqua bidest. Pro 100 ml wurden 5 ml 0,2 molar Acetatpuffer pH 5 zugefügt. (Für das erste und das zweite Bad wurde eine Photoschale verwendet, die durch Plexiglaseinsätze unterteilt war.) (1 Liter Lösung: 650 ml Aqua bidest., 0,5 g BDHC, 1 g Natriumnitroprussid, 300 ml Äthanol absol., 50 ml Acetatpuffer 0,2 molar pH 5)

Die zweite Lösung enthielt zusätzlich zu den Bestandteilen der ersten noch 0,012 % H₂O₂ (≙ 40 µl 30 % H₂O₂ pro 100 ml). Die Schnitte verweilten darin 25 min bei 20° C. Anschließend wurden die Schnitte für 20 min in ein Stabilisationsbad von 4° C umgesetzt. Die Zusammensetzung dieser Lösung war: 50 % Äthanol absol., 9 % Natriumnitroprussid, Acetatpuffer wie oben, Aqua bidest. ad 100 %. (1 Liter Lösung: 500 ml Äthanol absol., 9 g Natriumnitroprussid, 50 ml Acetatpuffer 0,2 molar pH 5, 450 ml Aqua bidest.)

(Um die Zeit im Kühlschrank für jeden Schnitt genau einhalten zu können, wurden hier einzelne kleine Glasgefäße verwendet.)

Aus dem Stabilisationsbad kamen die Schnitte in Aqua bidest. und wurden dort auf Objektträgern aufgefangen. Die Objektträger wurden vorher in Chrom-Alaun-Gelatine getaucht. Die aufgefangenen Schnitte wurden an der Luft getrocknet (3 - 6 h). Bei einem Versuch wurde 16 h lang luftgetrocknet, ohne eine Verbesserung oder Verschlechterung feststellen zu können.

Die trockenen Objektträger wurden nun zur Gegenfärbung in eine 1 %ige Lösung gepufferten Neutralrotes für 3 min gegeben. Die Neutralrotlösung wurde mit einem 0,2 molar Acetatpuffer pH 4,8 angesetzt und gefiltert.

Anschließend wurden die Schnitte kurz in bidest. Wasser gewaschen (1 min). Dann durchliefen sie zur Dehydratation folgende Alkoholreihe: Äthanol 96 % - Äthanol 100 % - Isopropanol - Isopropanol. In jedem Alkohol wurden sie 2 - 3 min belassen. Vom Alkohol wurden sie durch zwei Xylolbäder befreit; im ersten waren sie 3 - 5 min, im zweiten 7 - 10 min. Anschließend wurden die Objektträger gesäubert und die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

Nicht gegengefärbte Schnitte wurden nach dem Lufttrocknen sofort in Äthanol 96 % - Äthanol 100 % - Xylol 1 - Xylol 2 nacheinander gesetzt. Die Zeiten entsprechen den oben genannten.

Vier Vergleichsversuche von BDHC (Benzidindihydrochlorid) und DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrachlorid) wurden mit und ohne Gegenfärbung durchgeführt. Dabei war die Zahl der markierten Neuronen mit der BDHC-Methode stets höher als bei der DAB-Methode, so daß die DAB-Methode nicht weiter fortgeführt wurde.

Änderungen für die empfindlichere TMB-Methode nach Mesulam (31)

Um die MPO-Aktivität möglichst wenig herabzusetzen, wird bei der transkardialen Durchspülung nach Perfusion des Fixierungsmittels zusätzlich noch mit zwei Liter 0,1 molar Phosphatpuffer pH 7,4 mit 10 % Saccharose durchspült. Das anschließend entnommene Gehirn wird in die gleiche Pufferlösung bei 4° C für 2 - 24 h gegeben. Nach dem Schneiden können die Schnitte in dieser Pufferlösung (ohne Zucker) noch für mehrere Stunden (bis 96 Std.) bei 4° C aufgehoben werden.

Die Schnitte werden dann 3mal je 1 min in dest. Wasser gewaschen. Das erste Bad (Vorbild), in das die Schnitte für 20 min bei 19 - 23° C gelegt werden, wird aus zwei Lösungen hergestellt, die erst kurz vor Einlegen der Schnitte zusammengegeben werden. Man setzt 2,5 ml der Lösung B zu 97,5 ml der Lösung A zu. Lösung A enthält 92,5 ml dest. Wasser, 5 ml Acetatpuffer pH 3,3 und 100 mg Natriumnitroprussid. Lösung B enthält 5 mg TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin) und 2,5 ml absol. Alkohol. Um das TMB aufzulösen, erhitzt man auf 37 - 40° C. Der Acetatpuffer pH 3,3 wird wie folgt hergestellt: 200 ml 1 molar Natriumacetat, 200 ml dest. Wasser, 190 ml HCl; mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen und dann mit Essigsäure oder NaOH pH-Wert exakt einstellen. Die Lösungen A und B sollten nicht älter als zwei Stunden sein.

Beim zweiten Bad (Reaktionsbad) wird zum ersten Bad H₂O₂ hinzugefügt. Man gibt 2,5 - 4,5 ml 0,3 % H₂O₂ zu 100 ml des ersten Bades hinzu. Die Schnitte verweilen hier bei 19 - 23° C für 20 min. Wie auch das erste Bad, sollte diese Lösung mit den Schnitten auf einer Rüttlerplatte (mit geringen Amplituden) stehen. Die optimale H₂O₂-Konzentration muß man für jeden Fall selbst ausprobieren.

Das Stabilisationsbad kann weggelassen werden. Die Schnitte werden in Wasser gewaschen, dem 5 ml Acetatpuffer pH 3,3 zu 95 ml dest. Wasser zugegeben worden sind. Hierin können die Schnitte bis zu 4 h bei 4° C aufbewahrt werden.

Nachdem die Schnitte auf Objektträgern mit Chrom-Alaun-Gelatine aufgefangen worden sind, werden sie an der Luft 5 - 24 h lang getrocknet. Anschließend werden sie mit Neutralrot gegengefärbt.

Man gibt 40 ml Acetatpuffer pH 4,8 zu 1 l 1 % wässriger Neutralrotlösung (Acetatpufferherstellung: 500 ml 0,1 molar Essigsäure, 750 ml 0,1 molar Natriumacetat). Die Lösung wird vor Gebrauch gefiltert.

Die Gegenfärbung erleichtert das Erkennen cytoarchitektonischer Strukturen und stabilisiert die TMB-Reaktionsfärbung. Andererseits unterdrückt die Gegenfärbung die Sichtbarkeit und die Klarheit der einzelnen Strukturen der TMB-Färbung unter dem Mikroskop. Aus diesen Gründen ist es sinnvoll, jeden zweiten Schnitt gegenzufärben.

Das TMB-Reaktionsprodukt ist sehr empfindlich gegenüber Äthanol. (Bei 30 min in 100 % Äthanol ist die TMB-Färbung ganz verschwunden.) Deshalb darf man die Schnitte nur kurz in Alkohol entwässern.

Ohne Gegenfärbung: Die getrockneten Objektträger werden zur Dehydratation zweimal je 15 Sekunden in 100 % Äthanol getaucht. Anschließend kommen sie zweimal für 1 - 15 min in Xylol und werden dann eingedeckt.

Mit Gegenfärbung: Die getrockneten Objektträger werden 3 min in der Neutralrotlösung belassen. Dann werden sie nacheinander 15 s in dest. Wasser, 15 s in 70 % Äthanol, 15 s in 96 % Äthanol und zweimal 15 s in 100 % Äthanol gesetzt. Zur Entfernung des Alkohols kommen sie zweimal in Xylol, zuerst 1 min, dann 1 - 30 min und werden dann eingedeckt.

Anwendung der Methodik am Beispiel der afferenten und efferenten Verbindungen zwischen Corpus geniculatum mediale und primärer Hörrinde

Im Zusammenhang mit elektrophysiologischen Untersuchungen der zentralen Hörbahn sind die Verbindungen zwischen Corpus geniculatum mediale und Hörrinde von besonderem Interesse. Wenn auch mit klassischen anatomischen Methoden derartige Verbindungen längst beschrieben sind (z.B. 2, 3, 5, 27, 28, 36, 37, 46, 47, 50, 53, 54, 57), so erscheint es doch vorteilhaft, ergänzend die Meerrettichperoxydase-methode anzuwenden und damit mehr über die genauere Organisation*) der geniculocorticalen Verbindungen und der Unterteilungen von Corpus geniculatum mediale und Hörrinde zu erfassen und um weitere Unterteilung der Kerngebiete auf Grund der Verbindungen zu anderen Regionen vornehmen zu können.

Als Anwendungsbeispiele werden deshalb markierte Zellen im Bereich der Hörrinde nach Injektion von Meerrettichperoxydase in das Corpus geniculatum mediale sowie markierte Zellen im Corpus gen. med. nach Injektion von Meerrettichperoxydase in die primäre Hörrinde vorgestellt.

*) z.B. führen kleinere Läsionen in AII, in Ep oder Ins nicht zu nachweisbarer retrograder Degeneration im Thalamus, dies wurde durch hypothetische Kollateralverbindungen erklärt.

Legende zu Abb. 10 a-d: BDHC-gefärbte Zellen nach Injektion von Meerrettichperoxydase (MPO) in die primäre Hörrinde. Der Schnitt ist nicht gegengefärbt.

- a) Gefärbte Zellen im Corpus geniculatum mediale. Gen med = Corpus geniculatum mediale, Hippo = Hippocampus, TO = Tractus opticus, m = medial, c = caudal, l = lateral, o = oral.
- b) Vergrößerung des in Abb. 10a eingezeichneten Rechteckes.
- c + d) Vergrößerungen der in Abb. 10b eingezeichneten Rechtecke.

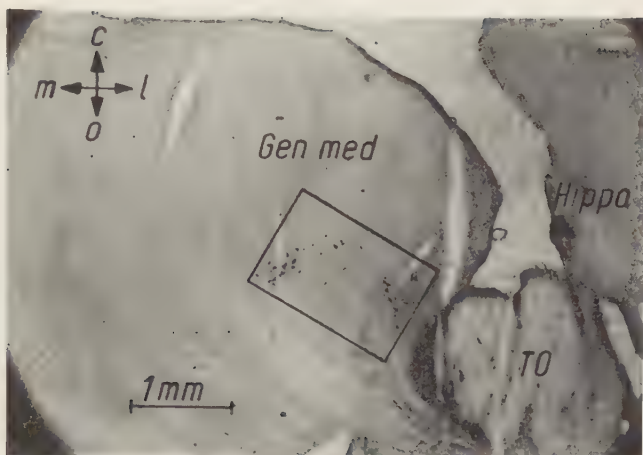


Abb. 10 a

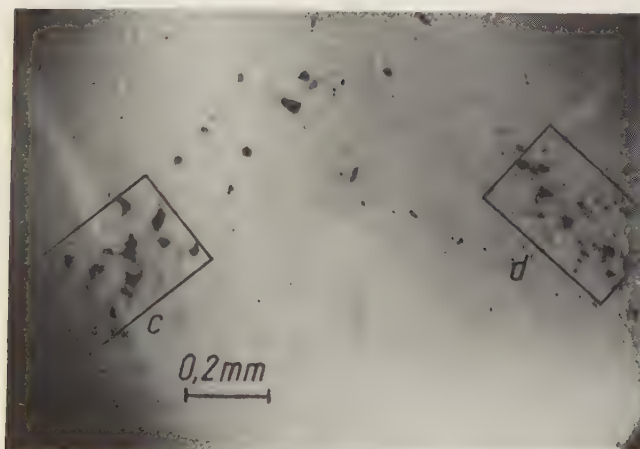


Abb. 10 b

Legende zu Abb. 10 a-d s.S. 23

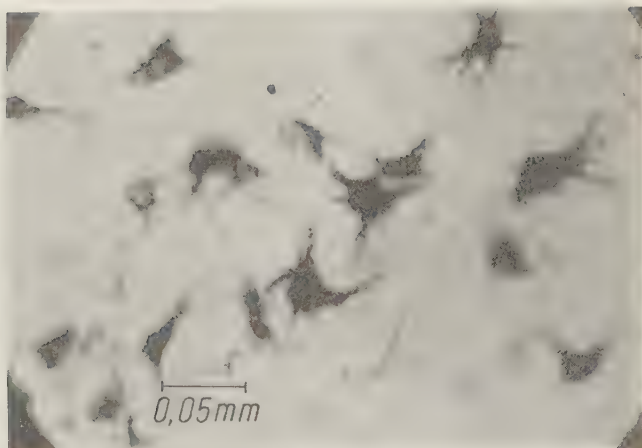


Abb. 10 c

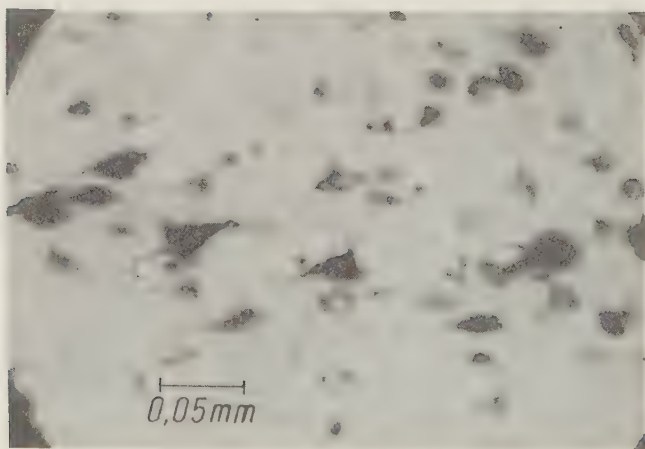


Abb. 10 d

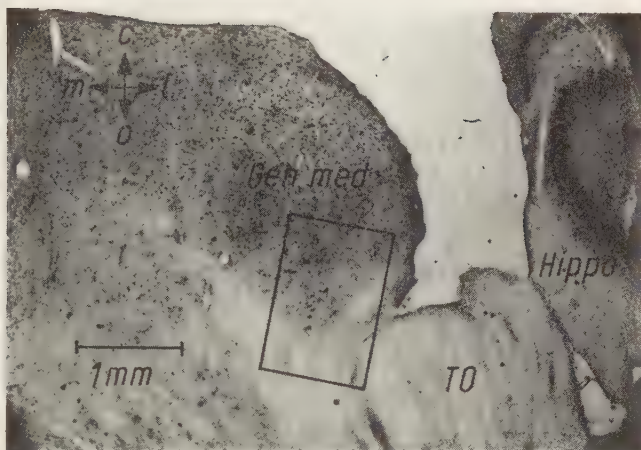


Abb. 11 a

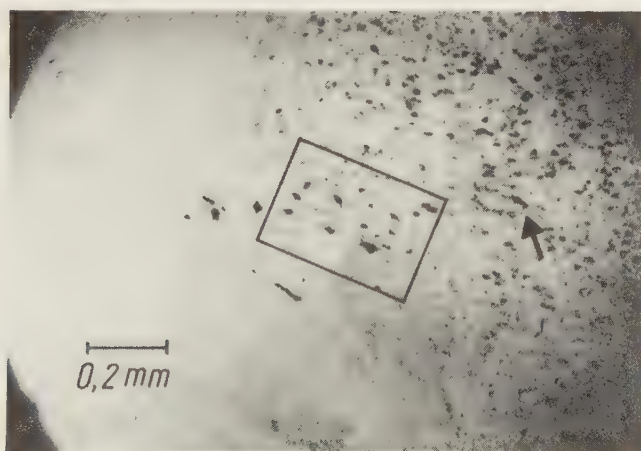


Abb. 11 b

Legenden zu Abb. 11 a-c, 12 a-c, 13 a-d s.S. 31

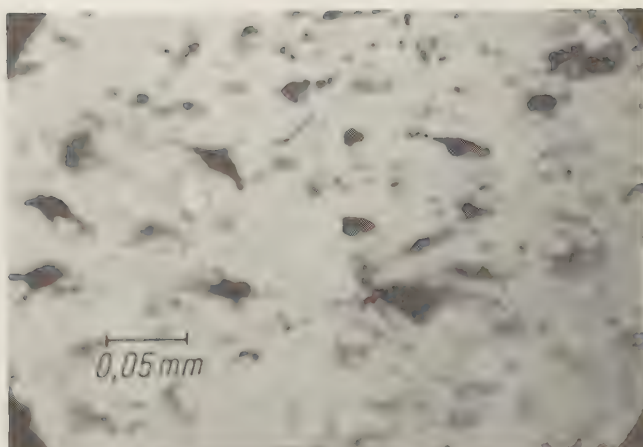


Abb. 11 c

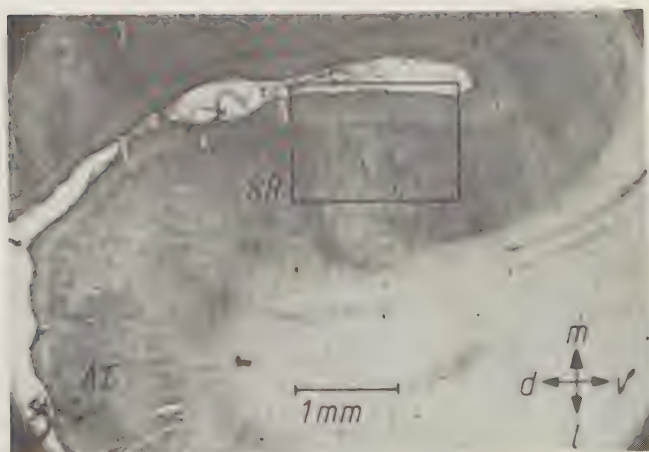


Abb. 12 a



Abb. 12 b

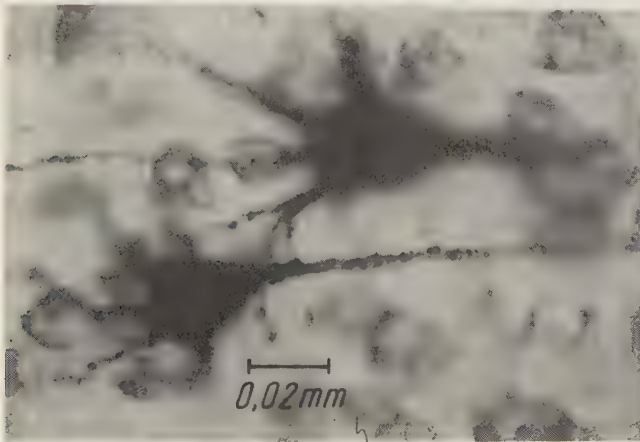


Abb. 12 c

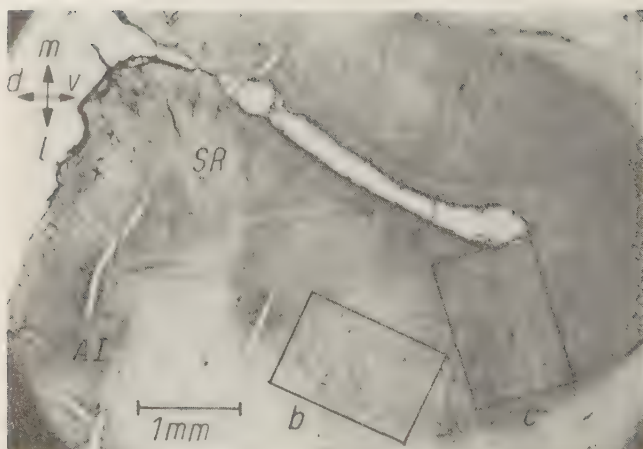


Abb. 13 a

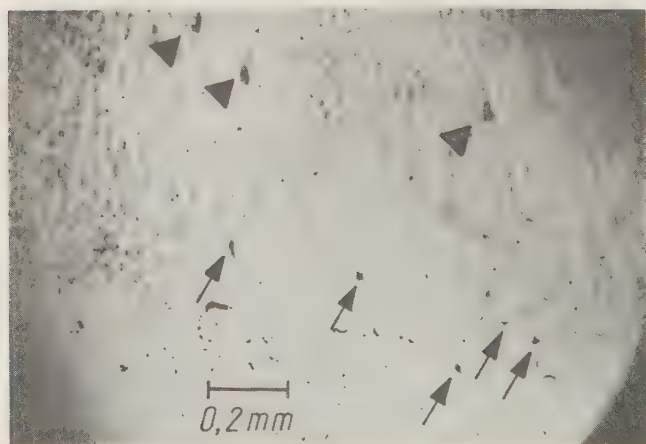


Abb. 13 b

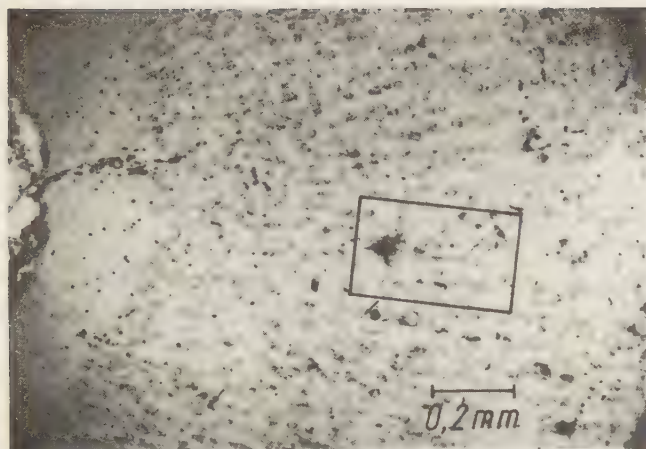


Abb. 13 c

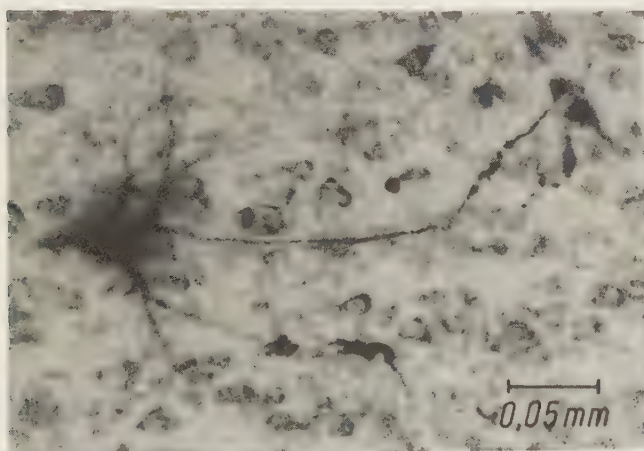


Abb. 13 d

Legende zu Abb. 11 a-c: BDHC-gefärbte Zellen nach Injektion von MPO in die primäre Hörrinde. Dieser Schnitt wurde mit Neutralrot gegengefärbt.

- a) Durch die Gegenfärbung ist der Hippocampus leicht erkennbar (bereits makroskopisch), im Gegensatz zum Schnitt in Abb. 10a, der ohne Gegenfärbung ist. Durch die Gegenfärbung ist eine leichtere und bessere Orientierung möglich. Gen med = Corpus geniculatum mediale, Hippo = Hippocampus, TO = Tractus opticus, m = medial, c = caudal, l = lateral, o = oral.
- b) Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 11a: Ein Nachteil der Gegenfärbung ist das schwierigere Erkennen der mit MPO-gefärbten Zellen. Der Pfeil zeigt auf eine mit MPO-markierte Zelle, die sich schlecht von den mit Neutralrot gegengefärbten Zellen in der Umgebung abhebt.
- c) Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 11b

Legende zu Abb. 12 a-c: MPO-markierte Zellen in SR und AI nach Injektion von MPO in das Corpus geniculatum mediale. Die injizierten Mengen waren zu groß, um eine genaue Lokalisation im Corpus geniculatum mediale angeben zu können.

- a) AI = primäre Hörrinde, SR = suprasylvischer Rand, m = medial, d = dorsal, l = lateral, v = ventral.
- b) Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 12a: Die Pfeile geben die mit MPO-markierten Neuronen an.
- c) Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 12b

Legende zu Abb. 13 a-d: MPO-markierte Zellen in SR und AI nach Injektion von MPO in das Corpus geniculatum mediale.

- a) AI = primäre Hörrinde, SR = suprasylvischer Rand, m = medial, d = dorsal, l = lateral, v = ventral.
- b) Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 13a: Die Pfeile zeigen zu den MPO-markierten Neuronen, die in der 5. und 6. Schicht der Rinde liegen. Die Dreiecke geben große intensiv mit Neutralrot gefärbte Zellen an.
- c + d) Riesige mit MPO-markierte Zelle mit ihren Fortsätzen. Abb. 13c: Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 13a; Abb. 13d: Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 13c.

D i s k u s s i o n

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß die im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute Technik einwandfrei funktioniert. Sie ist für zukünftige Routineanwendung geeignet. Es wäre allerdings erforderlich, diese als Anwendungsbeispiel dargestellten Untersuchungen systematisch fortzusetzen, wenn die Verbindungen zwischen Thalamus und Hörrinde erschöpfend aufgezeigt werden sollen. Dies ist jedoch erst für einen längeren Zeitabschnitt unter Verwendung der bei den elektrophysiologischen Experimenten freiwerdenden Versuchstieren vorgesehen.

Während der Durchführung dieser Arbeit erschienen vier Veröffentlichungen, die sich vor allem mit der afferenten Verbindung zwischen Thalamus und Hörrinde unter Benutzung der Meerrettichperoxydasemethode befassen (4, 38, 39, 56^{*)}). Im Hinblick auf die nach Injektion in die Rinde im Corpus geniculatum mediale nachweisbare markierte Neuronenverteilung ist deshalb ein Vergleich möglich. Dabei zeigt sich gute Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit denen aus der Literatur, wenn man die unterschiedliche Schnittführung (frontal gegenüber horizontal) beachtet (Abb. 14 und 15). Es scheint sich nämlich herauszustellen, daß jeder der cytoarchitektonisch unterschiedlichen Teile der Hörrinde (AI, AII, SF, Ep, Ins und Temp) jeweils Hauptprojektionsgebiet eines zugeordneten thalamischen Teilkernes ist, daß aber jeder der thalamischen Teilkerne (mit Ausnahme des ventralen Teiles des Corpus geniculatum mediale, der nur zu AI projiziert) zu mehreren Teilgebieten der Hörrinde projiziert und jedes corticale Teilgebiet von mehreren thalamischen Unterkernen Fasern erhält. Der magnocelluläre Anteil des Corpus geniculatum mediale projiziert dabei in alle Teile der Hörrinde. Meerrettichperoxydaseinjektion in AI führt deshalb zu einem dichten Band markierter Zellen im ventralen Teil des Corp.gen.med. (Abb. 10 und 11) und zu diffus verteilten markierten Zellen in der Pars magnocellularis (Abb. 10) und im Bereich der posterior group.

^{*)} Eine kurze Vorwegmitteilung dieser Arbeit erschien von Raczkowski et al. 1975.

Im Hinblick auf die corticothalamischen Verbindungen stimmen die hier vorliegenden Befunde nur teilweise (Abb. 13b) mit den bisherigen Befunden überein, nach denen die deszendierenden Fasern zum Colliculus inferior aus der 5. Rindenschicht, diejenigen zum Corpus geniculatum mediale aus der 6. Rindenschicht stammen (44). Die Zahl unserer Untersuchungen läßt aber noch keine definitive Aussage zu.

Das schwierigste Problem bei der Anwendung der Meerrettichperoxydase methodik für den Nachweis neuronaler Verbindungen liegt in der einwandfreien Bestimmung der Grenzen des Gewebebereiches, der durch Diffusion mit Meerrettichperoxydase von der Injektionsstelle aus versorgt wird und aus dem tatsächlich Peroxydase pinozytiert und axonal transportiert wurde. Vieles spricht dafür, daß diese Grenzen nicht mit denen der Anfärbarkeit des Injektionsbereiches zusammenfallen, zumal die Diffusion bis zum Färbeprozess anhält, aber auch Verkleinerung des anfärbbaren Bereiches bei zu langer Überlebenszeit stattfindet.

Serienversuche zeigten, daß benachbart gewählte Injektionsstellen, deren Anfärbbereiche einander überlappten, zu unterschiedlichen Bereichen markierter Zellkörper führten (56). Daraus läßt sich schließen, daß nur aus einem Zentralbereich der Injektionsstelle der axonale Transport erfolgt. Doch ist dieser Bereich eben nicht eindeutig abgrenzbar. Es wird deshalb gerne vom virtuellen Injektionsbereich ("virtual injection site") gesprochen, der durch dichte und gleichmäßige Verteilung des Reaktionsproduktes im Neuropil gekennzeichnet ist. Auch dieser virtuelle Injektionsbereich hängt aber von der Überlebenszeit (35, 52), von der Fixationsmethode (48) und von der Sensitivität der histochemischen Prozedur (10, 31) ab.

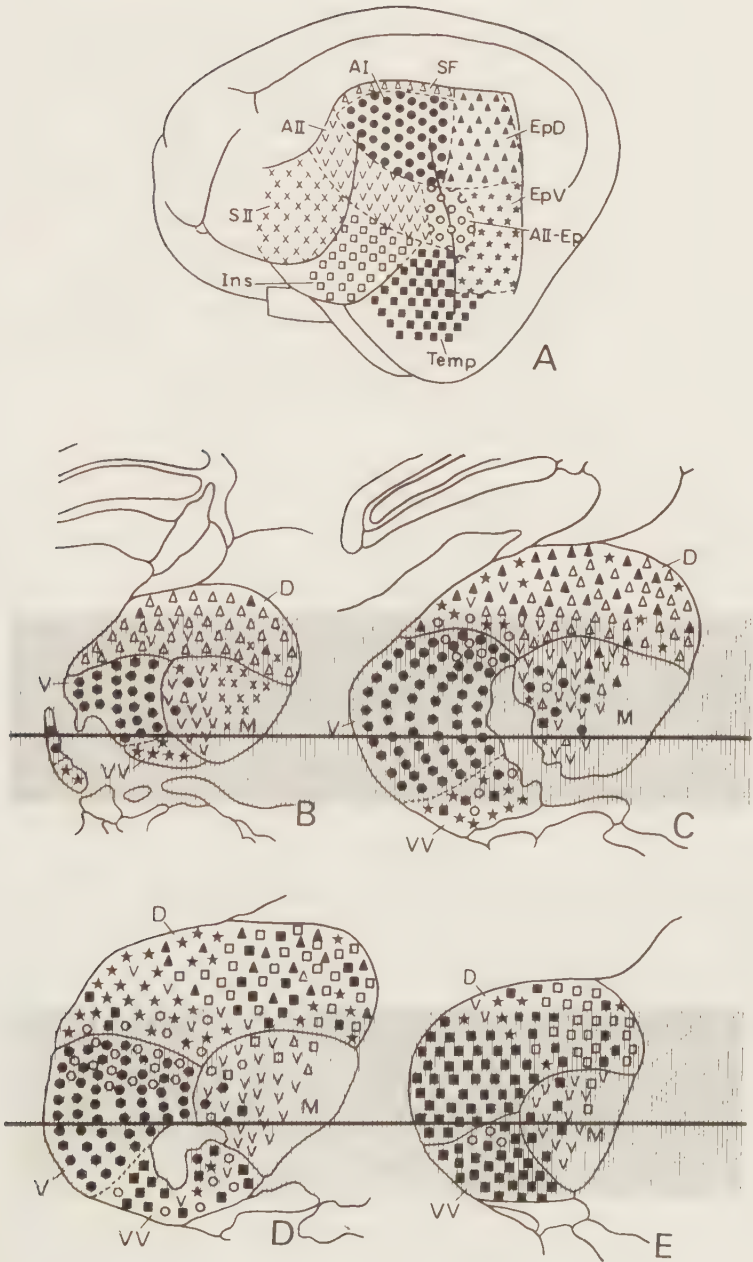


Abb. 1/4

Abb. 14 A - E: Zusammenfassende Diagramme zeigen den Aufbau der corticalen Projektionen des Corpus geniculatum mediale. A stellt die Einteilung der Hörrinde dar. B, C, D und E zeigen die repräsentativen Frontalschnitte des Corpus geniculatum mediale.

schwarze Kreise:	Projektionen zu AI
weiße Kreise:	" zur AII-Ep-Übergangszone
schwarze Dreiecke:	" zur dorsalen Ep
weiße Dreiecke:	" zu SF
schwarze Vierecke:	" zur Temporalregion
weiße Vierecke:	" zur Inselregion
Sterne:	" zur ventralen Ep
Kreuze:	" zu SII
V-Form:	" zu AII

Abkürzungen:

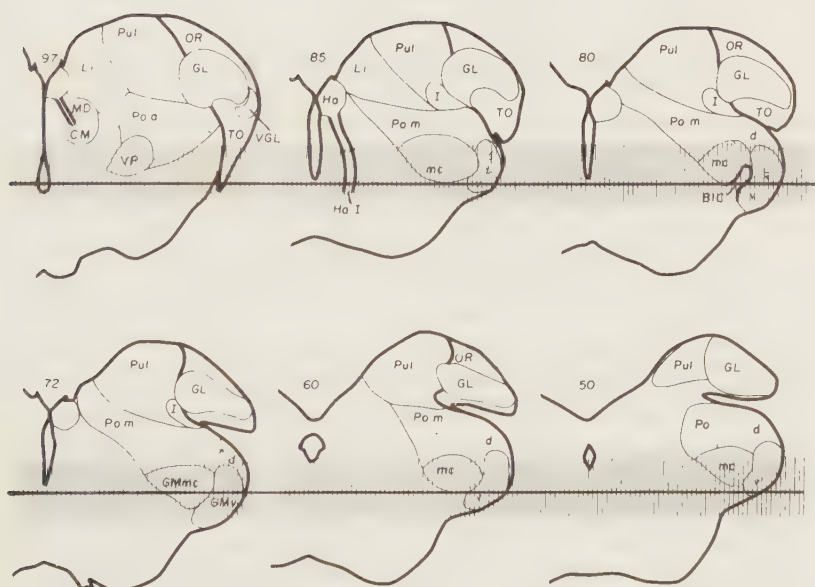
AI	primäre Hörrinde
AII	sekundäre Hörrinde
AII-Ep	AII-Ep-Übergangszone
Ep	ektosylvische hintere Hörrinde
EpD	dorsaler Anteil der Ep
EpV	ventraler Anteil der Ep
Ins	insulärer Cortex
SF	suprasylvischer Rand
SII	sekundäre somatosensorische Rinde
Temp	temporale Hörrinde
D	dorsaler Teil der Pars principalis des Corpus geniculatum mediale
M	magnocellulärer Teil des Corpus geniculatum mediale
V	laminärer Teil der ventralen Pars principalis des Corpus geniculatum mediale
VV	ventromedialer Anteil der ventralen Pars principalis des Corpus geniculatum mediale

(Nach Niimi und Matsuoka 1979.)

Die schraffierte Zone zeigt ungefähr den Bereich an, in dem bei den Horizontalschnitten im Corpus geniculatum mediale markierte Zellen gefunden wurden. Der Strich entspricht in etwa der Höhe des Horizontalschnittes in Abb. 11a.



a)



b)

Abb. 15 a, b

Abb. 15: a) Der Punkt gibt die Einstichstelle an, die bei der Injektion in die primäre Hörrinde gewählt wurde.

b) Verteilung der markierten Neuronen nach Injektion von 0,1 μ l MPO mit einer Konzentration von 30 % in die primäre Hörrinde. Die Zahlen geben die fortlaufenden Schnitte (Frontalschnitte) an, wobei caudal begonnen wurde.

Abkürzungen:

BIC	Brachium des Nucleus inferior
CM	Nucleus centralis thalami
d	dorsaler Anteil des Corpus geniculatum mediale
GL	dorsaler Anteil des Corpus geniculatum laterale
GMmc,mc	Corpus geniculatum mediale, Pars magnocellularis
GMv,v	ventraler Anteil des Corpus geniculatum mediale
Ha	Habenula
HaI	Tractus habenulo-interpeduncularis
I	Pulvinar, Pars inferior
Lat	Gyrus lateralis
Li	Nucleus intermedius lateralis
MD	Nucleus medialis dorsalis
MSS	mittlerer suprasylvischer Sulcus
OR	Radiatio optica
PES	Sulcus ectosylvius posterior
Poa	anteriorer Teil der posterioren Gruppe
Pom	medialer Teil der posterioren Gruppe
Pul	Pulvinar
TO	Tractus opticus
VGL	ventraler Anteil des Corpus geniculatum laterale
VP	venteroposterolateraler Nucleus

(Nach Winer et al. 1977.)

Die schraffierte Zone entspricht - wie in Abb. 14 - dem Bereich, in dem MPO-markierte Zellen gefunden wurden. Der Strich entspricht in etwa der Höhe des Horizontalschnittes in Abb. 11a.

Die eindeutige Begrenzung des wirksamen Injektionsbereiches zeigt die Grenze der mit Meerrettichperoxydasetechnik gewonnenen Aussagemöglichkeiten auf. Probleme, die sich aus der Anfärbung durch endogene Enzyme (15) oder im Hinblick auf die Unterscheidung von Endothelzellen gegenüber Neuronen (35) oder auch hinsichtlich der Aufnahme von Meerrettichperoxydase durch Neuriten, die nur durch das Injektionsgebiet hindurchziehen aber nicht dort enden, (23), ergeben, sowie Peroxydaseaufnahme durch verletzte Neuriten (8, 25) und etwaiger anterograder Transport sind dagegen von untergeordneter Bedeutung.

Trotz dieser Einschränkungen bietet die Meerrettichperoxydase-methode große Vorteile gegenüber der Degenerationsmethodik, die vor allem im Nachweis von verstreut liegenden markierten Zellen und im Nachweis kollateraler Verbindungen liegen. Erhaltene kollaterale Verbindungen mögen die Ergebnisse retrograder Degenerationsuntersuchungen gerade bei den thalamocorticalen Verbindungen hinsichtlich der Interpretation erschwert haben. Auch ist der retrograde Transport besonders geeignet, die laminäre Organisation der Rinde und den Ursprung efferenter Bahnen aus den Schichten III, V und VI zu untersuchen (55).

Z u s a m m e n f a s s u n g

Das aus der Literatur bekannte Verfahren, mit Hilfe von Meerrettichperoxydase neuronale Verbindungen im Bereich des Zentralnervensystems nachzuweisen, wurde mit dieser Arbeit zu einer unter den speziellen Bedingungen des Institutes für Physiologie und Biokybernetik der Universität Erlangen möglichen Routine-methode entwickelt. Nach der Ermittlung besonders günstiger Bedingungen im Hinblick auf Pipettenspitzenform, Injektionsgeschwindigkeit, Konzentration der Meerrettichperoxydase, Überlebenszeit und der empfindlichsten Nachweismethodik wurde als Anwendungsbeispiel dieses Verfahren für den Nachweis thalamocorticaler und corticothalamischer Verbindungen der zentralen Hörbahn benutzt. Die dabei erkennbar werdenden thalamocorticalen Verbindungen stimmen gut, die corticothalamischen nur teilweise mit der Literatur überein. Es ist jedoch erforderlich, die als Anwendungsbeispiele dargestellten Untersuchungen systematisch fortzusetzen, wenn die Verbindungen zwischen Thalamus und Rinde erschöpfend aufgezeigt werden sollen und bevor Verbindliches über die hier gezeigten Befunde ausgesagt werden kann. Dies ist aber erst für einen längeren Zeitabschnitt unter Verwendung der bei den elektrophysiologischen Versuchen im Institut freiwerdenden Versuchstiere vorgesehen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1.) Adams, J.C.: Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker.
Neuroscience 2, 141-145 (1977)
- 2.) Ades, H.W.: Connections of the medial geniculate body in the cat.
Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) 45, 138-144 (1941)
- 3.) Butler, R.A., Diamond, I.T. and Neff, W.D.: Role of auditory cortex in discrimination of changes in frequency.
J. Neurophysiol. 20, 108-120 (1957)
- 4.) Diamond, I.T.: The Auditory Cortex.
In: Evoked Electrical Activity in the Auditory Nervous System.
Eds.: Naunton, R.F. and Fernández, C.;
Academic Press, New York-San Francisco-London 1978
- 5.) Diamond, I.T., Jones, E.G. and Powell, T.P.S.: The projection of the auditory cortex upon the diencephalon and brain stem in the cat.
Brain Research 15, 305-340 (1969)
- 6.) Gonatas, N.K., Harper, C., Mizutani, T. and Gonatas, J.O.: Superior Sensitivity of Conjugates of Horseradish Peroxidase with Wheat Germ Agglutinin for Studies of Retrograde Axonal Transport.
J. Histochem. Cytochem. 27, 728-734 (1979)
- 7.) Graham, R.C.Jr. and Karnovsky, M.J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique.
J. Histochem. Cytochem. 14, 291-302 (1966)
- 8.) Halperin, J.J. and LaVail, J.H.: A study of the dynamics of retrograde transport and accumulation of horseradish peroxidase in injured neurons.
Brain Research 100, 253-269 (1975)
- 9.) Hanker, J.S., Yates, P.E., Metz, C.B. and Rustioni, A.: A new specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase.
Histochem. J. 9, 789-792 (1977)

- 10.) Hardy, H. and Heimer, L.: A safer and more sensitive substitute for diaminobenzidine in the light microscopic demonstration of retrograde and anterograde axonal transport of HRP.
Neuroscience Letters 5, 235-240 (1977)
- 11.) Holland, V.R., Saunders, B.C., Rose, F.L. and Walpole, A.L.: A safer substitute for benzidine in the detection of blood.
Tetrahedron 30, 3299-3302 (1974)
- 12.) Kallert, S.: Kühlungsuntersuchungen der Zusammenarbeit von Hörrinde und Thalamuskern der Hörbahn.
In: Interaktion zwischen Artikulation und akustischer Perzeption.
Hrsg.: Spreng, M.;
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1980
- 13.) Kallert, S. und Kroha, E.: Reversible Kälteblockade der primären Hörrinde bei der wachen Katze.
Naturwissenschaften 65, 211 (1978)
- 14.) Keefer, D.A.: Horseradish peroxidase as a retrogradely-transported, detailed dendritic marker.
Brain Research 140, 15-32 (1978)
- 15.) Keefer, D.A. and Christ, J.F.: Distribution of endogenous diaminobenzidine-staining cells in the normal rat brain.
Brain Research 116, 312-316 (1976)
- 16.) Keidel, W.D.: Informationsphysiologische Aspekte des Hörens.
Studium Generale 22, 49-82 (1969)
- 17.) Keidel, W.D.: Optische und akustische Zeichenerkennung beim Menschen.
Naturwiss. Rundschau 23, 491-498 (1970)
- 18.) Keidel, W.D.: Neuere Ergebnisse der akustischen Informationsverarbeitung.
Naturwiss. Rundschau 24, 461-471 (1971)
- 19.) Keidel, W.D.: Codierung, Informationsfluß und Decodierung im Organismus.
Nova Acta Leopoldina 37, 225-250 (1972)
- 20.) Keidel, W.D. (Hrsg.): Physiologie des Gehörs.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1975

- 21.) Keidel, W.D.: Bedeutung des Zentralnervensystems für die Physiologie des Hörens.
HNO Berlin 24, 1-13 (1976)
- 22.) Keidel, W.D. and Kallert, S.: Auditory Nervous System.
In: Scientific Foundations of Otolaryngology.
Eds.: Hinchcliffe, R. and Harrison, D.;
William Heinemann Medical Books Ltd., London
1976
- 23.) Krishnan, N. and Singer, M.: Penetration of peroxidase into peripheral nerve fibers.
Amer. J. Anat. 136, 1-14 (1973)
- 24.) Kristensson, K. and Olsson, Y.: Retrograde axonal transport of protein.
Brain Research 29, 363-365 (1971)
- 25.) Kristensson, K. and Olsson, Y.: Retrograde transport of horseradish peroxidase in transected axons. 3. Entry into injured axons and subsequent localization in perikaryon.
Brain Research 115, 201-213 (1976)
- 26.) LaVail, J.H. and LaVail, M.M.: The retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: a light and electron microscopic study.
J. comp. Neurol. 157, 303-357 (1974)
- 27.) Locke, S.: The projection of the magnocellular medial geniculate body.
J. comp. Neurol. 116, 179-193 (1961)
- 28.) Macchi, G., Angeleri, F. and Guazzi, G.: Thalamo-cortical connections of the first and second somatic sensory areas in the cat.
J. comp. Neurol. 111, 387-405 (1959)
- 29.) Malmgren, L. and Olsson, Y.: A sensitive method for histochemical demonstration of horseradish peroxidase in neurons following retrograde axonal transport.
Brain Research 148, 279-294 (1978)
- 30.) Mesulam, M.-M.: The blue reaction-product in horseradish peroxidase neurohistochemistry: incubation parameters and visibility.
J. Histochem. Cytochem. 24, 1273-1280 (1976)

- 31.) Mesulam, M.-M.: Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents.
J. Histochem. Cytochem. 26, 106-117 (1978)
- 32.) Mesulam, M.-M. and Rosene, D.L.: Differential sensitivity between blue and brown reaction procedures for HRP neurohistochemistry.
Neuroscience Letters 5, 7-14 (1977)
- 33.) Mesulam, M.-M. and Rosene, D.L.: Sensitivity in Horseradish Peroxidase Neurohistochemistry: A Comparative and Quantitative Study of Nine Methods.
J. Histochem. Cytochem. 27, 763-773 (1979)
- 34.) Nagasawa, J., Douglas, W.W. and Schultz, R.A.: Micropinocytotic origin of coated and smooth microvesicles ('synaptic vesicles') in neurosecretory terminals of posterior pituitary glands demonstrated by incorporation of horseradish peroxidase.
Nature (Lond.) 232, 341-342 (1971)
- 35.) Nauta, H.J.W., Pritz, M.B. and Lasek, R.J.: Afferents to the rat caudoputamen studied with horseradish peroxidase. An evaluation of a retrograde neuroanatomical research method.
Brain Research 67, 219-238 (1974)
- 36.) Neff, W.D. and Diamond, I.T.: The neural basis of auditory discrimination.
In: Biological and Biochemical Bases of Behavior.
Eds.: Harlow, H.F. and Woolsey, C.N.;
University of Wisconsin Press, Madison 1958
- 37.) Niimi, K. and Naito, F.: Cortical Projection of the Medial Geniculate Body in the Cat.
Exp. Brain Res. 19, 326-342 (1974)
- 38.) Niimi, K. and Matsuoka, H.: Thalamocortical Organization of the Auditory System in the Cat Studied by Retrograde Axonal Transport of Horseradish Peroxidase.
Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, Vol. 57, Springer-Verlag, Berlin 1979
- 39.) Oliver, D.L. and Hall, W.C.: The Medial Geniculate Body of the Tree Shrew, *Tupaia glis*. II. Connections with the Neocortex.
J. comp. Neurol. 182, 459-494 (1978)

- 40.) de Olmos, J.S.: An Improved HRP Method for the Study of Central Nervous Connections.
Exp. Brain Res. 29, 541-551 (1977)
- 41.) de Olmos, J. and Heimer, L.: Mapping of collateral projections with the HRP-method.
Neuroscience Letters 6, 107-114 (1977)
- 42.) de Olmos, J., Hardy, H. and Heimer, L.: The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP study.
J. comp. Neurol. 181, 213-244 (1978)
- 43.) Raczkowski, D., Diamond, I.T. and Winer, J.: Organization of thalamocortical auditory system in the cat studied with horseradish peroxidase.
Brain Research 101, 345-354 (1975)
- 44.) Ravizza, R.J., Straw, R.B. and Long, P.D.: Laminar origin of efferent projections from auditory cortex in the golden Syrian hamster.
Brain Research 114, 497-500 (1976)
- 45.) Reinoso-Suárez, F.: Topographischer Hirnatlas der Katze für experimental-physiologische Untersuchungen.
Hrsg. von E. Merck AG, Darmstadt 1961
- 46.) Rose, J.E. and Woolsey, C.N.: The relations of thalamic connections, cellular structure and evocable electrical activity in the auditory region of the cat.
J. comp. Neurol. 91, 441-466 (1949)
- 47.) Rose, J.E. and Woolsey, C.N.: Cortical connections and functional organization of thalamic auditory system of the cat.
In: Biological and Biochemical Bases of Behavior.
Eds.: Harlow, H.F. and Woolsey, C.N.;
University of Wisconsin Press, Madison 1958
- 48.) Rosene, D.L. and Mesulam, M.-M.: Fixation variables in horse-radish peroxidase neurohistochemistry. I. The effects of fixation time and perfusion procedures upon enzyme activity.
J. Histochem. Cytochem. 26, 28-39 (1978)
- 49.) Schwerdtfeger, W.K.: The Use of Rhodamin B for the Identification of Injected Horseradish Peroxidase in the Brain.
Histochemistry 58, 237-239 (1978)

- 50.) Sousa-Pinto, A.: Cortical Projections of the Medial Geniculate Body in the Cat.
Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, Vol. 48, Fasc. 2, Springer-Verlag, Berlin 1973
- 51.) Streit, P. and Reubi, J.C.: A new and sensitive staining method for axonally transported horseradish peroxidase (HRP) in the pigeon visual system.
Brain Research 126, 530-537 (1977)
- 52.) Vanegas, H., Hollander, H. and Distel, H.: Early stages of uptake and transport of horseradish peroxidase by cortical structures, and its use for the study of local neurons and their processes.
J. comp. Neurol. 177, 193-212 (1978)
- 53.) Waller, W.H.: Thalamic degeneration induced by temporal lesions in the cat.
J. Anat. (London) 74, 528-536 (1940)
- 54.) Wilson, M.E. and Cragg, B.G.: Projections from the medial geniculate body to the cerebral cortex in the cat.
Brain Research 13, 462-475 (1969)
- 55.) Winer, J.A.: A review of the status of the horseradish peroxidase method in neuroanatomy.
Biobehavioral Reviews 1, 45-54 (1977)
- 56.) Winer, J.A., Diamond, I.T. and Raczkowski, D.: Subdivisions of the Auditory Cortex of the Cat: The Retrograde Transport of Horseradish Peroxidase to the Medial Geniculate Body and Posterior Thalamic Nuclei.
J. comp. Neurol. 176, 387-418 (1977)
- 57.) Woolliard, H.H. and Harpman, J.A.: The cortical projections of the medial geniculate body.
J. Neurol. Psychiat. 2, 35-44 (1939)
- 58.) Wünsche, B.: Über den Einfluß reversibler Ausschaltung der primären Hörrinde auf die Erkennung von Schallreizzeitmustern.
Dissertation, in Vorbereitung
- 59.) Zachs, S.I. and Saito, A.: Uptake of exogenous horseradish peroxidase (HRP) by coated vesicles in mouse neuromuscular junctions.
J. Histochem. Cytochem. 17, 161-170 (1969)

Mein Dank gebührt Herrn Professor Dr.med. Wolf D. K e i d e l
für die Überlassung des Themas.

Ganz besonders danke ich Herrn Professor Dr.med. S. K a l l e r t
für Ratschläge und großzügige Hilfe bei allen Fragen, die sich im
Laufe der Arbeit ergaben.

Frau A. P f i s t e r danke ich für viele Hilfeleistungen bei
den Versuchen und für die sorgfältige Gestaltung des Manuskriptes.

Herrn cand.med. B. W ü n s c h e gilt mein Dank für die stän-
dige Assistenz bei den Operationen.

Frau L. B u r i a n und Herrn K. B u r i a n danke ich für
die Herstellung der Photos, sowie Herrn R. B a c h m a n n für
technische Hilfeleistungen.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für
stete Hilfsbereitschaft und überaus große Freundlichkeit bedanken,
so daß das Arbeiten im Institut mir stets Freude bereitete.

L e b e n s l a u f

Als zweites von drei Kindern des Pressers Oskar Hickel und seiner Ehefrau Anna, geb. Mayer, wurde ich am 16. Februar 1955 in Unterrodach jetzt Marktrodach (Kreis Kronach) geboren. Mein Glaubensbekenntnis ist römisch-katholisch. Von 1961 - 1965 besuchte ich die Volksschule in Unterrodach, anschließend das Kaspar-Zeuß-Gymnasium (mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig) in Kronach bis zum Abitur am 21.6.1974.

Vom 1. Juli 1974 bis 30. September 1975 absolvierte ich den Grundwehrdienst als Fernmelder in Regensburg.

Das Studium der Zahnmedizin begann ich im Wintersemester 1975/76 an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen. Hier bestand ich am 10. August 1976 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 6. April 1978 die zahnärztliche Vorprüfung. Am 12. Dezember 1980 legte ich die zahnärztliche Prüfung mit Erfolg ab.

THE HISTORY OF THE

REIGN OF

CHARLES THE FIRST

IN WHICH ARE CONTAINED THE MOST IMPORTANT AND INTERESTING

EVENTS OF HIS REIGN, FROM HIS MARRIAGE TO HIS DEATH

IN THE YEAR 1649

BY

JOHN BURNET, BISHOP OF SALISBURY

IN TWO VOLUMES

LONDON, PRINTED BY J. BARNARD, IN ST. MARTIN'S LANE, 1764

THE SECOND VOLUME

CONTAINING THE HISTORY OF HIS REIGN, FROM HIS DEATH

TO THE END OF HIS REIGN

IN THE YEAR 1649

BY

JOHN BURNET, BISHOP OF SALISBURY

IN TWO VOLUMES

LONDON, PRINTED BY J. BARNARD, IN ST. MARTIN'S LANE, 1764

